昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，May 2008，51（5）：486－491　　ISSN 0454-6296

蟑螂浓核病毒（pfDNV）非结构基因启动子的活性研究

杨　波[1,2]，董小敏[2]，蔡大威[2]，刘志刚[1]，胡　征[1]，汪浩勇[1]，张珈敏[2]，胡远扬[2]

（1. 湖北工业大学生物技术系，武汉　430068；2. 武汉大学病毒学国家重点实验室，武汉　430072）

摘要：为了研究蟑螂 *Periplaneta fuliginosa* **浓核病毒（pfDNV）非结构基因转录调控的机制，用** PCR **的方法从蟑螂浓核病毒基因组** DNA **中扩增了非结构蛋白基因** *ns*3 **翻译起始密码子上游** 325 bp **的启动子序列；并进一步以其作为模板，利用聚合酶链式反应技术，得到** 6 **个不同长度的启动子片段和两个定点突变体片段，构建由其驱动的萤火虫荧光素酶基因报告质粒，在脂质体介导下转染多种昆虫细胞，体外分析了该启动子的活性。结果表明：该** 325 bp DNA **片段在** Sf9，S2，Tn368 **及** Ld652 **细胞中均具有较高的启动子活性；其转录起始基序** CAGT **对维持该启动子的基本转录活性而言是必需的，而** TATA **盒对此则是非必需的，但它的存在可显著提高启动子的转录活性。同时，我们还发现，病毒非结构蛋白** NS1 **对该启动子具有反式激活作用，并且这种激活作用的大小取决于** NS1 **蛋白在细胞中的浓度。**

关键词：蟑螂浓核病毒；启动子；反式激活；昆虫细胞；表达载体

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296（2008）05-0486-06

Characterization of the nonstructural gene promoter of *Periplaneta fuliginosa* densovirus

YANG Bo[1,2]，DONG Xiao-Min[2]，CAI Da-Wei[2]，LIU Zhi-Gang[1]，HU Zheng[1]，WANG Hao-Yong[1]，ZHANG Jia-Min[2]，HU Yuan-Yang[2]　（1. Department of Biotechnology，Hubei University of Technology，Wuhan 430068，China；2. State Key Laboratory of Virology，Wuhan University，Wuhan 430072，China）

Abstract： To understand the mechanism of transcriptional regulation of *Periplaneta fuliginosa* densovirus （PfDNV） nonstructural genes，5′-flanking sequence of *ns*3 gene （325 bp），which encompasses the region from the 5′-terminus of the viral genome to the translation initiation codon of the *ns*3 gene，was cloned. This construction was subsequently used as a template for generation of six 5′- or 3′-end unidirectional truncation mutants and two site-directed mutants in the PCR amplification. These amplified products were subcloned into the report plasmid pGL3-basic and the resultant plasmids were transfected into several insect cell lines. The results indicated that the 325 bp DNA sequence possessed promoter activity in insect cell lines including Sf9，Ld652，Tn368，and S2 cells. Subsequent promoter deletion analysis showed that the promoter had a TATA-dependent and TATA-independent transcriptional activity. In addition，we found that the transcriptional activity of this promoter could be transactivated by the viral nonstructural protein NS1 in a concentration-dependent fashion in S2 cells.

Key words： *Periplaneta fuliginosa* densovirus （PfDNV）；promoter；transactivation；insect cells；expression vector

蟑螂浓核病毒（*Periplaneta fuliginosa* densovirus，PfDNV）是一种单链线性 DNA 病毒，属细小病毒科，浓核病毒亚科。该病毒是由胡远杨等从武汉地区大面积死亡的蟑螂体内分离得到的（Hu *et al*.，1994）。PfDNV 基因组全长 5 454 bp，其正、负链均编码蛋白质，且等比例包装于成熟的病毒粒子中。该病毒基因组正链上有 3 个 ORF，分别编码非结构蛋白 NS1，NS2 与 NS3，编码区内基因相互重叠；其基因组负

基金项目：湖北工业大学博士科研启动基金

作者简介：杨波，男，1979 年生，博士，讲师，研究方向为分子病毒学，E-mail：skywalkeryoung@yahoo.com

收稿日期 Received：2007-11-14；接受日期 Accepted：2008-01-11

链上的 3 个 ORF 则编码 5 种结构蛋白(Guo *et al*.，2000)。研究表明，其结构蛋白 mRNA 是通过利用一套特殊的选择性拼接机制而加工成熟的，而这种加工机制在其他浓核病毒中均未发现(Yamagishi *et al*.，1999)。正是由此特点，在 2004 年召开的病毒学分类委员会第八次会议上，蟑螂浓核病毒被单独分列为一个属：*Pefudensovirus*，并以其本身作为代表种(Mayo，2004)。与其他细小病毒一样，蟑螂浓核病毒基因组末端也具有末端倒转重复序列(ITR)，其长度为 202 bp，位于 ITR 末端的 122 bp 的序列能形成 U 型发卡结构，可作为病毒基因组进行滚环复制的引物。计算机分析表明在 ITR 中存在有 TATA box、GC box、转录起始基序 TCAGT 等启动子特征序列，但其转录活性尚未作研究。位于 ITR 内的这两个潜在启动子可能分别控制结构与非结构基因的转录。

为了研究 PfDNV 非结构基因的转录机制，本实验采用 PCR 方法克隆了 *ns*3 基因起始密码子上游的 325 bp 的病毒基因组末端序列，并由其进一步得到 6 个不同长度的启动子片段及两个定点突变体片段，构建由其驱动的萤火虫荧光素酶基因报告质粒，用果蝇 S2 细胞系体外分析了这个处于 ITR 内的 *ns*3 基因启动子的特性，以及 NS1 蛋白的共表达对其转录活性的影响。同时我们还分析了该启动子在不同昆虫细胞中的启动活性，为下一步利用其构建病毒表达载体打下基础。

1　材料与方法

1.1　材料

果蝇细胞 S2，草地贪夜蛾细胞 Sf9，舞毒蛾细胞 Ld652，粉纹夜蛾培养细胞 Tn368，宿主菌 TOP10，含有苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV) *ie*-1 基因启动子序列的质粒 pIE，含蟑螂浓核病毒 *ns*1 基因编码框的原核表达质粒 pET28-NS1，含 PfDNV 全基因组的重组质粒 PfDNV-pUC119(张晓东等，1999)均由本室保存。

1.2　试剂

酶等主要试剂为 TaKaRa 公司产品；Grace 昆虫细胞培养基、胎牛血清(FBS)、lipofectin 试剂为 Invitrogen 公司产品；pGL3-Basic、pRL-SV40 载体及双荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品；pAc5.1/V5-His B 果蝇细胞表达载体购自 Invitrogen 公司。各种核苷酸引物合成、测序由上海英骏生物工程公司完成。

1.3　方法

1.3.1　PCR 引物设计：按照 GenBank 登录的 PfDNV 基因组全序列，在 *ns*3 基因上游，即病毒基因组末端 325 bp 范围内，设计 4 条上游引物及 3 条下游引物，分别导入 *Kpn* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 酶切位点(下划线部分)：PF1，5′-TATGGTACCTGGCCATAGCTTCGCTATACC-3′；PF2，5′-TATGGTACCCAAAGGCCATG TGTCCGG-3′；PF3，5′-TCTGGTACCCCAAGCACCAAGGGGAAG-3′；PF4，5′-GCTGGTACCGCGCGCAGAGCGGGAGCGTC-3′；PR1，5′-GCTCTCGAGTCCCGCTCTGCGCGCGCTT-3′；PR2，5′-GCACTCGAGCGACTGACGCTCCCGCTCTG-3′；PR3，5′-GCACTCGAGGCTTACCAGCTTTGTACAC-3′；为了在 TATA box 中引入点突变，我们设计一对引物如下(下划线部分为突变位点)：FM1，5′-GGAAGCGAGGAGAGAAAAGAAGCGC-3′；RM1，5′-TGCGCGCGCTTCTTTTCACACCTCGCTT-3′；同时，另一对引物：FM2，5′-GCGGGAGCGTTGGTCGACAGAATAACATC-3′；RM2，5′-GATGTTATTCTGTCGACCAACGCTCCCGCTC-3′则是为了在转录起始基序 CAGT 中引入定点突变。

1.3.2　PfDNV *ns*3 基因 5′侧翼区片段的 PCR 扩增：以 pUC119-PfDNV 质粒 DNA 为模板，分别用 PF1/PR3，PF2/PR3，PF3/PR3，PF4/PR3，PF1/PR2，PF1/PR1 组合进行 PCR 扩增，扩增条件为 95℃预变性 4 min、94℃ 30 s、55℃ 90 s、72℃ 1 min，35 个循环后 72℃延伸 10 min。定点突变体则是按照《分子克隆》(Sambrook *et al*.，1989)所述方法，利用上述突变引物及末端引物进行两次 PCR 反应，即重叠延伸 PCR 而获得。具体反应条件如上。PCR 产物经凝胶电泳鉴定和分离后，用 glassmilk 纯化，获得 6 个不同长度的的 *ns*3 基因 5′侧翼区片段和 2 个人工定点突变体片段。

1.3.3　PfDNV *ns*3 基因启动子的克隆与序列测定：将纯化的上述 PCR 产物按照 T 载体连接试剂盒说明书进行连接，同时，按照常规方法进行转化、涂布平板(涂时加入 X-gal 和 IPTG)、挑白斑及酶切，筛选重组质粒。对鉴定阳性的菌株送于上海英骏公司进行测序，确证获得含有上述片段的阳性重组质粒。

1.3.4　报告质粒及 NS1 蛋白表达质粒的构建：用 *Kpn* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 酶切经测序确证的上述阳性重组质粒，切出的目的片段提纯回收。用 *Kpn* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切质粒 pGL3-Basic，酶切产物电泳回收，将上述两种回收产物连接、转化并挑取单克隆，经培养后提

取获得质粒，分别命名为 pGL3-(1－325)，pGL3-(60－325)，pGL3-(120－325)，pGL3-(183－325)，pGL3-(1－203)，pGL3-(1－193)，pGL3-(TATAmut)及 pGL3-(CAGTmut)，用 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切和 PCR 两种方法鉴定。同时，用 *Kpn* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ双酶从 pIE 质粒上切下完整的 AcMNPV *ie*-1 基因的启动子，将其克隆于 pRL-SV40 的 *Kpn* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ位点，构建内标质粒 pRL-IE1。NS1 表达质粒 pAC-NS1 是将 *ns*1 ORF 从原核表达质粒 pET-NS1 切下后与相同酶切过的瞬时表达载体 pAc5.1/V5-His B 相连接而获得。

1.3.5 S2 细胞的瞬时转染：将果蝇 S2 细胞(2.5×10^4个/孔)接种到 24 孔培养板中，用 Grace 完全培养基 27℃贴壁培养过夜。除去含 FBS 培养基，用无血清培养基洗细胞两次，用脂质体法将报告质粒、内标质粒 pRL-IE 和 NS1 表达质粒 pAC-NS1 共转染上述细胞，转染过程严格按照脂质体 Lipofectin Reagent 说明书进行。转染结束后每孔加入 2%的 FBS 的营养液 1 mL，继续培养直到对细胞进行处理为止。对 Sf9，Ld652，Tn368 细胞的转染也按如上方法进行。

1.3.6 荧光素酶活性检测：细胞转染 48 h 后，收集 24 孔板细胞，萤火虫及海肾荧光素酶活性的检测按试剂盒推荐的操作步骤进行，每个样品重复 3 次，并计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性比值为报告基因的表达水平。经标化的荧光素酶活性用 fold-induction 表示。

2 结果与分析

2.1 蟑螂浓核病毒 *ns*3 基因启动子序列的生物信息学分析

对克隆的 325 bp 的蟑螂浓核病毒 *ns*3 基因上游序列进行了序列测定，结果显示所克隆片段序列正确，与公布的蟑螂浓核病毒基因组中对应的序列(GenBank 登录号：AF192260)完全一致。计算机分析显示，该片段包含真核生物基因启动子的基本元件 TATA 盒、GC 框、转录起始基序 CAGT、转录因子 NF1 结合位点、以及 NS1 结合位点(图 1)。但是，这些元件是否具备功能，有待于进一步的实验证明。由于该启动子片段中的 TATA 盒位于病毒基因组的图距 3(map unit 3)，我们称其为 P3 启动子。

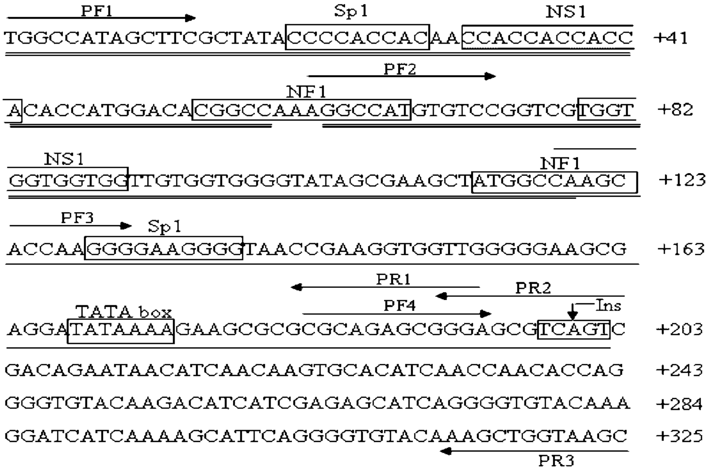
PF1
Sp1
NS1
TGGCCATAGCTTCGCTATACCCCACCACAACCACCACCACC +41
PF2
NF1
ACACCATGGACACGGCCAAAGGCCATGTGTCCGGTCGTGGT +82
NS1
NF1
GGTGGTGGTTGTGGTGGGGTATAGCGAAGCTATGGCCAAGC +123
PF3
Sp1
ACCAAGGGGAAGGGGTAACCGAAGGTGGTTGGGGGAAGCG +163
PR1
PR2
TATA box
PF4
Ins
AGGATATAAAAGAAGCGCGCGCAGAGCGGGAGCGTCAGTC +203
GACAGAATAACATCAACAAGTGCACATCAACCAACACCAG +243
GGGTGTACAAGACATCATCGAGAGCATCAGGGGTGTACAAA +284
GGATCATCAAAAGCATTCAGGGGTGTACAAAGCTGGTAAGC +325
PR3

图 1 黑胸大蠊浓核病毒 *ns*3 基因上游启动子序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of the 5′ region of *ns*3 gene of *Periplaneta fuliginosa* densovirus

方框为转录因子结合序列，单下划线为基因组末端倒置重复序列(ITR)，双下划线为 ITR 内的 回文结构，箭头表示 PCR 引物。Notable transcription factor binding motifs are indicated by boxes; the ITR sequence is underlined, and the hairpin region in the ITR is double underlined; the arrows indicate the location of primers used in PCR amplification.

2.2 P3 启动子在果蝇 S2 细胞中的活性

分别用 6 个不同长度的 P3 启动子片段控制的荧光素酶基因报告质粒转染 S2 细胞。48 h 后收集细胞，测定两种荧光素酶的活性，以及计算出比值，结果如图 2。结果表明，质粒 pGL3-(1－325)转染的细胞荧光素酶的表达量为空白对照 pGL3-Basic 的 30 倍(图 2)，说明该 325 bp 的全长启动子片段具有较高的转录活性。同时我们发现，该启动子的 2 个 5′端缺失突变体(片段 60－325 及 120－325)也保持了较高的转录活性；而另一个 5′端缺失突变体(片段 183－325)却丧失了 90%的转录活性，这可能与 TATA 框的缺失有关。另外，我们还发现，启动子 3′

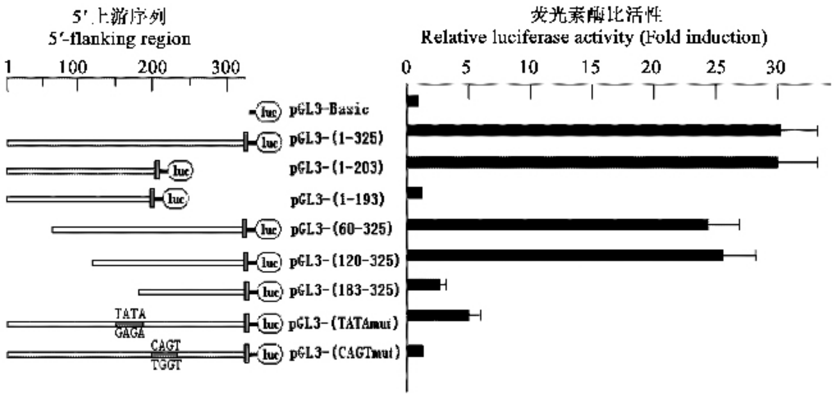

图 2　不同长度以及突变型 P3 启动子活性的比较

Fig. 2　Comparison of transcriptional activities of heterogeneous length and site-directed mutant P3 promoters

端的一个缺失突变体（片段 1 – 203），也保持了与全长启动子基本相同的转录活性，而另一个缺失突变体（片段 1 – 193），则完全丧失了转录活性，这可能与它缺少转录起始基序 CAGT 有关。在定点突变实验中，我们发现针对 TATA box 的定点突变可使该启动子片段的转录活性降低 80% 以上，而针对转录起始基序 CAGT 的定点突变则可使其完全丧失。

2.3　P3 启动子在几种昆虫细胞中的活性比较

用全长的 P3 启动子片段构建的报告质粒 pGL3-（1 – 325）按常规方法转染昆虫细胞系 Sf9，S2，Tn368 及 Ld652，48 h 后收集细胞，测定两种荧光素酶的活性，以及计算出比值，结果如图 3。我们发现，该启动子在这几种昆虫细胞中都具有转录活性，但强弱不一。其在果蝇 S2 细胞具有相对较高的活性，而在舞毒蛾卵巢细胞 Ld652 中则表现相对较弱。

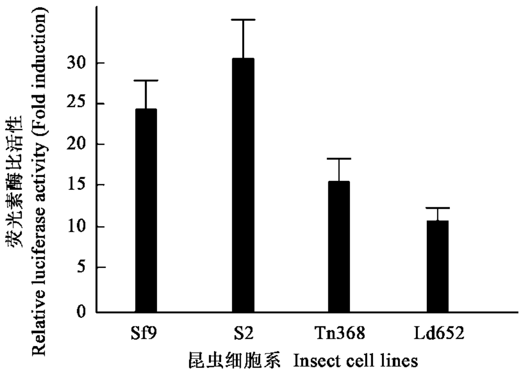

图 3　P3 启动子在不同昆虫细胞中的活性比较

Fig. 3　Promoter activity of P3 in various insect cell lines

2.4　NS1 蛋白增强 P3 启动子的活性

用报告质粒 pGL3-（1 – 325）和不同量的 NS1 蛋白顺式表达质粒 pAC-NS1 共转染果蝇 S2 细胞，同时以 pGL3-（1 – 325）单独转染的 S2 细胞为对照，48 h 后收集细胞，分别测定荧光素酶活性，计算出共转染与单独转染实验的荧光素酶活性比。此值为 NS1 蛋白增强 P3 启动子转录活性的倍数。结果表明，PfDNV NS1 蛋白对 P3 启动子具有很强的反式激活作用，随着 pAC-NS1 质粒浓度的提高，报告基因产物荧光素酶的表达量显著提高，共转染 200 ng 该顺式表达质粒可提高 P3 启动子转录活性达 6 倍（图 4）。

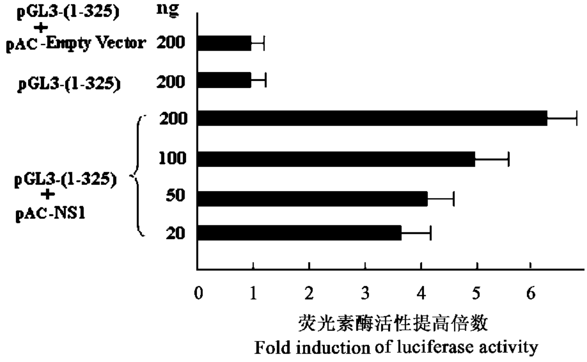

图 4　NS1 蛋白对 P3 启动子的反式激活作用

Fig. 4　Transactivation of P3 promter activity in S2 cells by NS1 protein

3　讨论

与浓核病毒亚科其他病毒一样，蟑螂浓核病毒基因组正、负链均编码蛋白质，而编码框都位于 5′端。序列分析表明，其非结构蛋白基因 ns3 的上游存在有一潜在的启动子结构，可能控制着非结构基因的转录。为了研究该启动子的特性，我们克隆了这个位于非结构基因 *ns*3 上游 325 bp 的基因组末端

序列。计算机分析显示，此段序列具有多种启动子特征序列，如 TATA box，GC box，initiator motif 等，这些特征序列均集中在长度为 202 bp 的病毒基因组末端重复序列（ITR）中。利用双荧光素酶报告实验，我们发现该启动子在多种昆虫细胞中均具有较强的转录活性。同时，5′端的单方向缺失突变实验显示，删除 ITR 中 120 bp 的回文序列对于该启动子的活性没有影响（图 2），而在这段序列中存在有一个 GC box。这个结果表明，该启动子中的这个 GC box 是没有功能的。由于昆虫细胞缺少转录因子 Sp1（Courey and Tjian，1988），所以这个结果也不难解释。同时，启动子 3′端的单方向缺失突变实验显示，删除位于转录起始位点和 *ns*3 基因翻译起始序列 ATG 之间的序列对启动子活性影响也非常小，而 Yamagishi 等（1999）的研究表明这段序列参与了非结构蛋白表达的调控。我们认为，可能是因为此调控方式还需病毒蛋白的参与，而在我们研究系统中，并没有引入病毒蛋白，故而此段序列的调控作用在我们的启动子活性实验中表现不出来。

在定点突变实验中，我们发现 TATA 框的突变虽然使得启动子的转录活性显著下降（下降约 80%），但并未使其完全丧失，而转录起始基序 CAGT 的突变则完全使该启动子失去活性。这个结果表明 CAGT 基序对保持该启动子的基本转录活性是至关重要的，而 TATA 框仅对于保持高转录活性而言是必须的。与此类似，杆状病毒的一些早期基因的启动子也具有这种 TATA box 非依赖性的转录活性。比如苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒早期基因 *gp*64 *efp* 的启动子，其只要有转录起始序列 CAGT 的存在，就能保持相当的转录活性，TATA box 的存在与否对启动子活性并不起决定性作用（Kogan *et al*.，1995）。由于这些属于不同启动子的转录起始基序在序列上的保守性和功能上的相似性，我们推测 P3 启动子的转录起始基序可能是通过与一种存在于昆虫细胞中的通用转录因子相互作用而发挥起始转录的功能，而这种相互作用正如 TATA box 能被 TBP 识别一样。本实验中该启动子在多种昆虫细胞中均具有转录活性的这一特点，也是上述推断能够成立的一个证据。

我们曾经报道，蟑螂浓核病毒 NS1 蛋白能结合于位于基因组末端回文序列中的 CAC 重复序列上作为复制起始蛋白，起始病毒基因组的复制（Yang *et al*.，2006）。在脊椎动物细小病毒中，例如鼠细小病毒 MVM，其 NS1 蛋白不仅能作为滚环复制起始蛋白，还可作为转录调节蛋白一方面增强病毒启动子 P38 的活性，另一方面抑制宿主基因的转录（Rhode and Richard.，1987；Faisst *et al*.，1993）。此外，MVM NS1 蛋白还可作为转录因子，在酵母双杂交实验中表现出自激活能力（Harris *et al*.，1999）。我们以前的研究表明，蟑螂浓核病毒 NS1 蛋白在酵母双杂交实验中并不能作为转录因子而表现出自激活活性（Yang *et al*.，2006）。而本研究的结果表明 PfDNV NS1 蛋白可显著提高 P3 启动子的活性，我们推测该蛋白虽然不是直接作为转录因子，但是可结合在位于启动子内部的 CAC 重复序列上，通过与细胞转录因子相互作用从而提高启动子的转录活性。与此类似，同属细小病毒科的人细小病毒 B19 的非结构蛋白 NS1 就可与 Sp1，NF-Kappa B 等转录因子结合，从而增强位于该病毒基因组末端的 P6 启动子的活性（Gareus *et al*.，1998）。

本研究结果基本阐明了蟑螂浓核病毒非结构基因启动子的特性，为进一步揭示其表达调控的机理打下基础。另外，基于浓核病毒 ITR 具有的染色体整合功能，以及这个位于 ITR 内的 P3 启动子能在多种昆虫细胞中保持较高活性的特点，在接下来的工作中我们可利用其构建宽宿主域的适合昆虫细胞的病毒稳定表达载体。

参考文献（References）

Courey AJ，Tjian R，1988. Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains，including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*，55：887－898.

Faisst SR，Grangette C，Schlehofer JR，Rommelaere J，1993. NFB upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMp. *Virology*，197：770－773.

Gareus R，Gigler A，Hemauer A，Leruez-Ville M，Morinet F，Wolf H，Modrow S，1998. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J. Virol*.，72：609－616.

Guo HT，Zhang JM，Hu YY，2000. Complete sequence and organization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus genome. *Acta Virol*.，44：315－322.

Harris CE，Boden RA，Astell CR，1999. A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol*.，73：72－80.

Hu YY，Zheng JM，Lizuka T，Bando H，1994. A densovirus newly isolated from the smoky-brown cockroach *Periplaneta fuliginosa*. *Arch. Virol*.，138：365－372.

Kogan PH，Chen X，Blissard GW，1995. Overalpping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus *gp*64 envelope fusion protein gene. *J. Virol*.，69：1 452－1 461.

Mayo MA，2004. Changes to virus taxonomy. *Arch. Virol.*，150：189 – 198.

Sambrook J，Fritsch EF，Maniatis T，1989. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press，USA.

Rhode SLD，Richard SM，1987. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.*，61：2 807 – 2 815.

Yamagishi J，Hu YY，Zheng JM，Bando H，1999. Genome organization and mRNA structure of *Periplaneta fuliginosa* densovirus imply alternative splicing involvement in viral gene expression. *Arch. Virol.*，144：2 111 – 2 124.

Yang B，Zhang JM，Cai DW，Li DL，Chen WG，Jiang H，Hu YY，2006. Biochemical characterization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus nonstructural protein NS1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*，342：1 188 – 1 196.

Zhang XD，Zhang JM，Guo HT，Zhu LH，Hu YY，1999. Rescue of infectious virions from recombinant plasmid with the genome of *Periplaneta fuliginosa* densovirus. *Virol. Sin.*，14：152 – 156. [**张晓东，张珈敏，郭海涛，朱丽华，胡远扬**，1999. **重组质粒转染蟑螂对黑胸大蠊浓核病毒的拯救. 中国病毒学**，14：152 – 156]

（责任编辑：赵利辉）